

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-217691

(43) 公開日 平成8年(1996)8月27日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00			A 6 1 K 37/02	
9/52			9/52	N
38/22			39/00	G
38/43			39/395	A
39/00			47/02	J
審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全 11 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-230841	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)9月8日	(72) 発明者	猪狩 康孝 兵庫県神戸市東灘区本山南町5丁目4番25-503号
(31) 優先権主張番号	特願平6-216449	(72) 発明者	山縣 豊 兵庫県神戸市須磨区道正台1丁目1番8-207号
(32) 優先日	平6(1994)9月9日	(72) 発明者	飯沼 智 兵庫県神戸市須磨区道正台1丁目1番1-308号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名) 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願平6-310291		
(32) 優先日	平6(1994)12月14日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 徐放性製剤

(57) 【要約】

【課題】エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の封入効率を高め、投与後初期の漏出を抑制した徐放性製剤の提供。

【解決手段】エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩と生体内分解性ポリマーとを含有してなる徐放性製剤。

【効果】本発明によれば、エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の封入効率を高め、投与後初期の漏出を抑制した徐放性製剤が得られる。また、本発明の徐放性製剤は、生体内投与後に該生理活性物質の生物活性を保持したまま徐放できる。さらに、徐放性製剤中の該生理活性物質が長期間にわたって安定に保たれ、生物活性の損失が少ない。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩と生体内分解性ポリマーとを含有してなる徐放性製剤。

【請求項 2】生理活性物質が水溶性ペプチドまたはその誘導体である請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 3】ペプチドがホルモン、サイトカイン、増血因子、増殖因子、酵素、可溶性または可溶化受容体、抗体、ペプチド性抗原、血液凝固因子または接着因子である請求項 2 記載の徐放性製剤。

【請求項 4】生理活性物質がホルモンである請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 5】ホルモンが成長ホルモンである請求項 4 記載の徐放性製剤。

【請求項 6】ホルモンがインスリンである請求項 4 記載の徐放性製剤。

【請求項 7】生理活性物質がサイトカインである請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 8】サイトカインがインターフェロンである請求項 7 記載の徐放性製剤。

【請求項 9】生理活性物質が増殖因子である請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 10】多価金属塩が遷移金属塩である請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 11】多価金属塩が亜鉛塩である請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 12】多価金属塩の水に対する溶解度が約 0 ないし約 0.1% (w/w) である請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 13】多価金属塩を約 0.1 ないし約 50% (w/w) 含有してなる請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 14】生体内分解性ポリマーが脂肪族ポリエステルである請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 15】脂肪族ポリエステルが乳酸及びグリコール酸の重合体である請求項 1 4 記載の徐放性製剤。

【請求項 16】乳酸及びグリコール酸の組成比 (モル/モル%) が 100/0 ないし約 40/60 である請求項 1 5 記載の徐放性製剤。

【請求項 17】重合体の重量平均分子量が約 3,000 ないし約 20,000 である請求項 1 5 記載の徐放性製剤。

【請求項 18】脂肪族ポリエステルが乳酸の単独重合体である請求項 1 4 記載の徐放性製剤。

【請求項 19】単独重合体の重量平均分子量が約 3,000 ないし約 20,000 である請求項 1 8 記載の徐放性製剤。

【請求項 20】マイクロカプセルである請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 21】マイクロカプセルが注射用である請求項 20 記載の徐放性製剤。

【請求項 22】注射用である請求項 1 記載の徐放性製剤。

【請求項 23】徐放性製剤の製造のためのエンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩および生体内分解性ポリマーの使用。

【請求項 24】エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩を生体内分解性ポリマーを含む油相に分散し s/o 型エマルジョンを調製し、得られた s/o 型エマルジョンを水相に添加し s/o/w 型エマルジョンを調製し、次いで得られた s/o/w 型エマルジョンを水中乾燥に付すことを特徴とする徐放性製剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩と生体内分解性ポリマーとを含有してなる徐放性製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】生理活性物質、特にペプチドまたはその誘導体は生体において種々の薬理作用を示すことが知られており、この内いくつかについては化学合成あるいは遺伝子工学、細胞工学の手法の発達により大腸菌、酵母、動物細胞、あるいはハムスターなどの生体を用いて大量に生産させ、医薬品としての応用が図られている。しかしながら、これらのペプチドは一般的に生体内での半減期が短いために、頻回投与が必要であり注射に伴う患者の肉体的負担は無視できないものがある。この問題を解決するために徐放性製剤を開発する種々の試みがなされている。水溶性生理活性物質、特に水溶性ペプチド（以下単にペプチドと称することもある）の徐放性製剤を開発するときの第 1 の問題点はペプチドの溶解性をいかにしてコントロールするかにある。即ち、ペプチドの放出速度を抑制することである。特表平 3-500286 号には不溶性亜鉛-プロタミン- α -インターフェロン複合体が開示されている。また、特開昭 63-2930 号には、ポリラクチドに巨大分子ポリペプチドを分散させたシステムが開示されている。特開平 5-221855 号および特開平 6-172208 号には水溶性ペプチドを水不溶性のペプチド塩に変換し、生体内分解性高分子重合物を含有する有機媒体に懸濁することにより水溶性ペプチドを効率良く微小球に取り込ませる技術が開示されている。該公報において用いられる水不溶性ペプチドは水溶性ペプチド分子内部の塩基性部に対する有機酸塩であり、パモエート、タンニン酸、ステアリン酸、またはバルミチン酸塩である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上記のように水溶性生理活性物質の徐放性製剤を製造する種々の試みがなされ

ているものの、まだ満足できるものではなく、水溶性生理活性物質の封入効率が高く、投与後初期の水溶性生理活性物質の漏出が抑制され、水溶性生理活性物質放出速度が一定で、しかも水溶性生理活性物質が安定である徐放性製剤の開発が望まれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の問題点を解決するため鋭意研究をおこなったところ、エンドセリン拮抗物質を除く酸性基を持つ水溶性ペプチド性生理活性物質またはその水溶性塩（以下、単に生理活性物質と称することもある）と水溶性多価金属塩とから生成する生理活性物質の水不溶または水難溶性多価金属塩

（以下、単に複合体と称することもある）を製造し、これを生体内分解性ポリマーに分散させることにより、生理活性物質の生体内分解性ポリマー中への取り込み効率が飛躍的に上昇し、生体に投与直後の薬物の漏出も少ない徐放性製剤が得られることを見いだした。この知見に基づいてさらに研究した結果、本発明を完成した。すなわち本発明は、（１）エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩と生体内分解性ポリマーとを含有してなる徐放性製剤、（２）生理活性物質が水溶性ペプチドまたはその誘導体である前記（１）記載の徐放性製剤、（３）ペプチドがホルモン、サイトカイン、増血因子、増殖因子、酵素、可溶性または可溶性受容体、抗体、ペプチド性抗原、血液凝固因子または接着因子である前記（２）記載の徐放性製剤、（４）生理活性物質がホルモンである前記（１）記載の徐放性製剤、（５）ホルモンが成長ホルモンである前記（４）記載の徐放性製剤、（６）ホルモンがインスリンである前記（４）記載の徐放性製剤、（７）生理活性物質がサイトカインである前記

（１）記載の徐放性製剤、（８）サイトカインがインターフェロンである前記（７）記載の徐放性製剤、（９）生理活性物質が増殖因子である前記（１）記載の徐放性製剤、（１０）多価金属塩が遷移金属塩である前記

（１）記載の徐放性製剤、（１１）多価金属塩が亜鉛塩である前記（１）記載の徐放性製剤、（１２）多価金属塩の水に対する溶解度が20℃で約0ないし約0.1%（w/w）である前記（１）記載の徐放性製剤、（１３）多価金属塩の水に対する溶解度が約0ないし約0.01%（w/w）である前記（１）記載の徐放性製剤、（１４）多価金属塩を約0.1ないし約50%（w/w）含有してなる前記（１）記載の徐放性製剤、（１５）多価金属塩を約0.1ないし約30%（w/w）含有してなる前記（１）記載の徐放性製剤、（１６）生体内分解性ポリマーが脂肪族ポリエステルである前記

（１）記載の徐放性製剤、（１７）脂肪族ポリエステルが乳酸及びグリコール酸の重合体である前記（１６）記載の徐放性製剤、（１８）乳酸及びグリコール酸の組成比（モル／モル%）が100／0ないし約40／60で

ある前記（１７）記載の徐放性製剤、（１９）組成比（モル／モル%）が約90／10ないし約45／55である前記（１８）記載の徐放性製剤、（２０）重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約20,000である前記（１７）記載の徐放性製剤、（２１）重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約14,000である前記（１７）記載の徐放性製剤、（２２）脂肪族ポリエステルが乳酸の単独重合体である前記（１６）記載の徐放性製剤、（２３）単独重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約20,000である前記（２２）記載の徐放性製剤、（２４）単独重合体の重量平均分子量が約3,000ないし約14,000である前記（２２）記載の徐放性製剤、（２５）マイクロカプセルである前記（１）記載の徐放性製剤、（２６）マイクロカプセルが注射用である前記（２５）記載の徐放性製剤、（２７）注射用である前記（１）記載の徐放性製剤、

（２８）徐放性製剤の製造のためのエンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩および生体内分解性ポリマーの使用、及び（２９）エンドセリン拮抗物質を除く水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩を生体内分解性ポリマーを含む油相に分散しs/o型エマルジョンを調製し、s/o型エマルジョンを水相に添加しs/o/w型エマルジョンを調製し、次いでs/o/w型エマルジョンを水中乾燥に付すことを特徴とする徐放性製剤の製造法に関する。

【0005】

【発明の実施の形態】本明細書において、アミノ酸、ペプチド等に関し、略号で表示する場合、IUPAC-IUB コミッション・オン・バイオケミカル・ノーメンクレチャー（Commission on Biochemical Nomenclature）による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものとし、また、アミノ酸に光学異性体があり得る場合、特に明示しなければL体を示すものとする。生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩における生理活性物質は、酸性基を持つ生理活性物質である。ここにおいて、酸性基としては、例えばカルボキシル基、スルホ基などが挙げられる。生理活性物質は、好ましくは分子内にペプチド結合を持つか、あるいはアミノ酸を含有し酸性基を持つ生理活性物質である。該酸性基はアミノ酸に由来してもよい。生理活性物質は、さらに好ましくは酸性基を持つペプチドまたはその誘導体である。生理活性物質は、生理活性物質の25℃で水に対する溶解度は1%（w/w）以上である。

【0006】生理活性物質は、二個以上のカルボキシル基を有していることが好ましい。生理活性物質の分子量は、約200ないし約200,000、好ましくは約200ないし約50,000、さらに好ましくは分子量約500ないし約40,000である。生理活性物質の活性として代表的なものとしては、ホルモン作用が挙げら

れる。また、該生理活性物質は天然物、合成物、半合成物、遺伝子工学の産物のいずれでもよい、さらにこれらの誘導体でもよい。これらの生理活性物質の作用機作は、作動性あるいは拮抗性のいずれでもよい。本発明の生理活性物質、特に水溶性ペプチドまたはその誘導体としては、例えばホルモン、サイトカイン、造血因子、増殖因子、酵素、可溶性または可溶化受容体、抗体またはそのフラグメント、ペプチド性抗原、血液凝固因子、接着因子あるいは該生理活性物質の受容体に結合しうる作動薬あるいは拮抗薬などが挙げられる。

【0007】ホルモンとしては、例えばインスリン、成長ホルモン、ナトリウム利尿ペプチド、ガストリン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、ヒト絨毛ゴナドトロピン（HCG）、モチリン、カリクレインなどが挙げられる。ホルモンは、好ましくはインスリン、成長ホルモンである。

【0008】サイトカインとしては、例えばリンホカイン、モノカインなどが挙げられる。リンホカインとしては、例えばインターフェロン（アルファ、ベータ、ガンマ）、インターロイキン（IL-2ないしIL-12）などが挙げられる。モノカインとしては、例えばインターロイキン1（IL-1）、腫瘍壊死因子などが挙げられる。サイトカインは、好ましくはリンホカインであり、さらに好ましくはインターフェロン（アルファ、ベータ、ガンマ）である。造血因子としては、例えばエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、トロンプオエチン、血小板増殖刺激因子、メガカリオサイトポテンシエーターなどが挙げられる。増殖因子としては、例えば塩基性あるいは酸性の繊維芽細胞増殖因子（FGF）あるいはこれらのファミリー（例、FGF-9など）、神経細胞増殖因子（NGF）あるいはこれらのファミリー、インスリン様成長因子（例、IGF-1、IGF-2など）、骨増殖に関与する因子（BMP）あるいはこれらのファミリーなどが挙げられる。酵素としては、例えばスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、ティッシュプラスミノゲンアクティベーター（TPA）などが挙げられる。可溶性受容体としては、可溶性インターロイキン6（IL-6）受容体、インスリン様成長因子結合タンパク質（IGFBP）、可溶性腫瘍壊死因子受容体、可溶性上皮成長因子受容体、可溶性インターロイキン1受容体などが挙げられる。可溶化受容体としては、公知の受容体、例えばインターロイキン1受容体、インターロイキン6受容体、腫瘍壊死因子受容体、ファス（Fas）リガンド等を遺伝子工学的手法で可溶化したもの等が挙げられる。抗体としては、例えばヒトモノクローナル抗体、マウス由来の可変部とヒト由来の定常部とからなるヒト-マウスキメラ

モノクローナル抗体などが挙げられる。抗体のタイプとしては、例えばIgM、IgG、IgEなどが挙げられる。抗原としては、例えば前記抗体によって認識されるものなどが挙げられ、さらに血小板、ウイルスなども挙げられる。血液凝固因子としては、例えば第VIII因子などが挙げられる。接着因子としては、フィブロネクチン、ICAM-1などが挙げられる。生理活性物質としては、さらにエンドセリン、Arg-Gly-Asp-Ser（RGDS）、脳下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド（PACAP）なども挙げられる。

【0009】生理活性物質は、水溶性多価金属塩と接触させることにより、生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩に変換される。水溶性多価金属塩における多価金属としては、例えばII価、III価あるいはIV価の金属が挙げられ、具体的にはアルカリ土類金属（例、カルシウム、マグネシウム等）、遷移金属〔鉄（II価、III価）、銅（II価）、亜鉛（II価）等〕、IIb属金属〔アルミニウム（II価、III価）等〕、IVb属金属〔スズ（II価、IV価）等〕等が挙げられる。多価金属は、好ましくはアルカリ土類金属または遷移金属、更に好ましくは亜鉛またはカルシウム、特に好ましくは亜鉛である。水溶性多価金属塩としては、多価金属と酸との塩、例えば多価金属と無機酸との塩または多価金属と有機酸との塩が挙げられる。多価金属と酸との塩は、好ましくは常温（20℃）で水に対する溶解度が約20mg/ml以上の塩、さらに好ましくは溶解度が約100mg/ml以上の塩、特に好ましくは溶解度が約200mg/ml以上の塩である。多価金属と無機酸との塩における無機酸としては、例えば塩酸、硫酸、硝酸、チオシアン酸が挙げられる。多価金属と有機酸との塩における有機酸としては、例えば脂肪酸カルボン酸、芳香族酸が挙げられる。脂肪酸カルボン酸は、好ましくは炭素数2ないし9の脂肪酸カルボン酸である。脂肪酸カルボン酸としては、例えば脂肪酸モノカルボン酸、脂肪酸ジカルボン酸、脂肪酸トリカルボン酸等が挙げられる。これらの脂肪酸カルボン酸は、飽和あるいは不飽和のいずれであってもよい。【0010】脂肪酸モノカルボン酸としては、例えば炭素数2ないし9の飽和脂肪酸モノカルボン酸（例、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カブロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸等）および炭素数2ないし9の不飽和脂肪酸モノカルボン酸（例、アクリル酸、プロピオール酸、メタクリル酸、クロトン酸、イソクロトン酸等）が挙げられる。脂肪酸ジカルボン酸としては、例えば炭素数2ないし9の飽和脂肪酸ジカルボン酸（例、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸等）および炭素数2ないし9の不飽和脂肪酸ジカルボン酸（例、マレイン酸、フマル酸、シトラコン酸、メサコン酸等）が挙げられる。脂肪酸トリカルボン酸としては、例えば炭素数2ないし9の飽和脂肪酸トリカルボン酸（例、トリカルバリル酸、

1、2、3-ブタントリカルボン酸等)が挙げられる。上記した脂肪族カルボン酸は、水酸基を1ないし2個有していてもよく、このような例としては、例えばグリコール酸、乳酸、グリセリン酸、タルトロン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸等が挙げられる。脂肪族カルボン酸は、好ましくは脂肪族モノカルボン酸である。脂肪族カルボン酸は、さらに好ましくは炭素数2ないし9の脂肪族モノカルボン酸、特に好ましくは炭素数2ないし3の飽和脂肪族モノカルボン酸である。脂肪族カルボン酸の特に好ましい具体例としては、例えば酢酸等が挙げられる。芳香族酸としては、例えば安息香酸、サリチル酸等が挙げられ、好ましくは安息香酸である。

【0011】多価金属と無機酸との塩、すなわち無機酸多価金属塩の具体例を挙げれば、例えばハロゲン化塩(例、塩化亜鉛、塩化カルシウム)、硫酸塩、硝酸塩、チオシアン酸塩等である。多価金属と脂肪族カルボン酸との塩、すなわち脂肪族カルボン酸多価金属塩の具体例を挙げれば、例えば酢酸カルシウム、酢酸亜鉛、プロピオン酸カルシウム、グリコール酸亜鉛、乳酸カルシウム、乳酸亜鉛、酒石酸亜鉛である。脂肪族カルボン酸多価金属塩の好ましい例を挙げれば、例えば酢酸カルシウム、酢酸亜鉛である。特に好ましい具体例を挙げれば酢酸亜鉛等である。多価金属と芳香族酸との塩、すなわち芳香族酸多価金属塩の具体例を挙げれば、例えば安息香酸塩、サリチル酸塩等である。特に好ましい具体例を挙げれば安息香酸亜鉛である。

【0012】生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩は、生理活性物質と水溶性多価金属塩とを溶媒中で混合することにより製造される。混合操作は、好ましくは水中で行われる。生理活性物質と水溶性多価金属塩とを水中で混合する際の量比(モル比)は、例えば1:1ないし1:1000、好ましくは1:1ないし1:100、より好ましくは1:1ないし1:50、特に好ましくは1:1ないし1:10である。また、両者の水中における濃度は、それぞれ単独の溶解度範囲内で、生成する複合体の溶解度以上の濃度であればよい。上記混合時の水溶液のpHは、生理活性物質の生理活性を損なわず、また、生理活性物質および水溶性多価金属塩それぞれの溶解性を極端に下げないpHが採用される。混合操作は、通常蒸留水中で行われるが、必要に応じて弱酸性、中性または弱アルカリ性に調整した水中で行ってもよい。本発明における水不溶性または水難溶性とは不可逆的なものではなく、可逆的であり、水に対する溶解度が非常に低いことを意味する。水に対する溶解度としては通常の温度(20℃)において約0ないし約0.1%(w/w)、さらに好ましくは約0ないし約0.01%(w/w)である。このようにして得られた生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩は、必要に応じて真空乾燥あるいは凍結乾燥した後用いられる。本発明の徐放性製剤中、生理活性物質の水難溶性多価金属塩

の含量は、一般的に約0.1%(w/w)ないし約50%(w/w)、好ましくは約1%(w/w)ないし約30%(w/w)である。

【0013】生体内分解性ポリマーとしては、水に難溶または不溶である高分子重合体、例えば脂肪族ポリエステル(例、 α -ヒドロキシカルボン酸類(例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)、ヒドロキシジカルボン酸類(例、リンゴ酸等)、ヒドロキシトリカルボン酸(例、クエン酸等)等の1種以上から合成された単独重合体、共重合体、あるいはこれらの混合物)、ポリ- α -シアノアクリル酸エステル、ポリアミノ酸(例、ポリ- γ -ベンジル-L-グルタミン酸等)が挙げられる。これらは、適宜の割合で混合して用いてもよい。重合の形式はランダム、ブロック、グラフトの何れでもよい。生体内分解性ポリマーは、好ましくは脂肪族ポリエステル(例、 α -ヒドロキシカルボン酸類(例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)、ヒドロキシジカルボン酸類(例、リンゴ酸等)、ヒドロキシトリカルボン酸(例、クエン酸等)等の1種以上から合成された単独重合体、共重合体、あるいはこれらの混合物)である。上記した脂肪族ポリエステル中、 α -ヒドロキシカルボン酸類(例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)の1種以上から合成された単独重合体、共重合体が確実な生体内分解性および生体適合性の観点から好ましい。脂肪族ポリエステルは、特に好ましくは α -ヒドロキシカルボン酸類(例、グリコール酸、乳酸、ヒドロキシ酪酸等)の1種以上から合成された共重合体である。また、これらの共重合体は混合して使用されてもよい。本発明における生体内分解性ポリマーは、自体公知の方法により製造される。

【0014】上記 α -ヒドロキシカルボン酸類はD-体、L-体、およびD、L-体の何れでもよいが、D-体/L-体(モル/モル%)が約75/25ないし約25/75の範囲のものが好ましい。D-体/L-体(モル/モル%)は、さらに好ましくは約60/40ないし約30/70である。上記 α -ヒドロキシカルボン酸類の共重合体の例としてはグリコール酸と他の α -ヒドロキシ酸類との共重合体が挙げられ、該 α -ヒドロキシ酸類としては乳酸、2-ヒドロキシ酪酸が好ましい。 α -ヒドロキシカルボン酸類の共重合体は、好ましくは乳酸-グリコール酸共重合体または2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体である。 α -ヒドロキシカルボン酸類の共重合体は、特に好ましくは乳酸-グリコール酸共重合体である。

【0015】乳酸-グリコール酸共重合体において、その組成比(乳酸/グリコール酸)(モル/モル%)は約100/0ないし約40/60が好ましい。該組成比は、さらに好ましくは約90/10ないし約45/55である。組成比は、特に好ましくは約80/40ないし約45/55である。乳酸-グリコール酸共重合体の重

量平均分子量は約3,000ないし約20,000、好ましくは約3,000ないし約14,000、さらに好ましくは約3,000ないし12,000である。また、乳酸-グリコール酸共重合体の分散度(重量平均分子量/数平均分子量)は約1.2から約4.0が好ましい。さらに好ましくは、約1.5から約3.5である。乳酸-グリコール酸共重合体は、自体公知の製造法、例えば特開昭61-28521号公報に記載の方法に従って合成できる。該共重合体は無触媒脱水重縮合で合成されたものが好ましい。2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体において、グリコール酸が約10ないし約75モル%、残りが2-ヒドロキシ酪酸である場合が好ましい。さらに好ましくは、グリコール酸が約20ないし約75モル%の場合である。特に好ましくは、グリコール酸が約30ないし約70モル%の場合である。2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体の重量平均分子量は、約2,000ないし約20,000が好ましい。2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体の分散度(重量平均分子量/数平均分子量)は約1.2ないし4.0が好ましい。分散度は、特に好ましくは約1.5ないし3.5である。2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体は公知の製造法、例えば特開昭61-28521号公報に記載の方法に従って合成できる。該共重合体は無触媒脱水重縮合で合成されたものが好ましい。上記 α -ヒドロキシカルボン酸類の単独重合体の好ましい例としては乳酸の単独重合体が挙げられる。乳酸単独重合体の重量平均分子量は約3,000ないし約20,000、好ましくは約3,000ないし約14,000である。乳酸単独重合体は、自体公知の製造法、例えば特開昭61-28521号公報に記載の方法に従って合成できる。該単独重合体は無触媒脱水重縮合で合成されたものが好ましい。

【0016】上記した2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体は、さらにポリ乳酸と混合して使用してもよい。該ポリ乳酸としては、D-体、L-体およびこれらの混合物の何れでもよいが、D-体/L-体(モル/モル%)が約75/25ないし約20/80の範囲のものが好ましい。D-体/L-体(モル/モル%)は、さらに好ましくは約60/40ないし約25/75である。D-体/L-体(モル/モル%)は、特に好ましくは約55/45ないし約25/75である。該ポリ乳酸の重量平均分子量は、約1,500ないし約20,000、好ましくは約1,500ないし約10,000である。また、ポリ乳酸の分散度は約1.2ないし約4.0が好ましい。分散度は、特に好ましくは約1.5ないし約3.5である。ポリ乳酸の製造法については、乳酸の二量体であるラクタイドを開環重合する方法と乳酸を脱水重縮合する方法が知られている。本発明で使用する比較的低分子のポリ乳酸を得るためには、乳酸を直接脱水重縮合する方法が好ましい。該方法は、例えば特開昭61

-28521号公報に記載されている。2-ヒドロキシ酪酸-グリコール酸共重合体とポリ乳酸とを混合して使用する場合、その混合比は例えば約10/90ないし約90/10(重量%)である。混合比は、好ましくは約20/80ないし約80/20である。混合比は、さらに好ましくは約30/70ないし70/30である。

【0017】本明細書中、重量平均分子量とは、重量平均分子量が120,000、52,000、22,000、9,200、5,050、2,950、1,050、580、162の9種類のポリスチレンを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)で測定したポリスチレン換算の分子量をいう。GPC測定により数平均分子量も計算される。分散度は重量平均分子量と数平均分子量とから計算される。GPC測定はGPCカラムKF804L x 2(昭和電工製)、RIモニターL-3300(日立製作所製)を使用し、移動相としてクロロホルムを用いた。

【0018】上記した無触媒脱水重縮合で合成される共重合体は、一般的に末端に遊離のカルボキシル基を有する。本発明において、生体内分解性ポリマーは、好ましくは末端に遊離のカルボキシル基を有する。末端に遊離のカルボキシル基を有する生体内分解性ポリマーとは、GPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する生体内分解性ポリマーである。末端基定量による数平均分子量は、以下のようにして算出される。約1gないし3gの生体内分解性ポリマーをアセトン(25ml)とメタノール(5ml)との混合溶媒に溶解し、フェノールフタレインを指示薬としてこの溶液中のカルボキシル基を0.05Nアルコール性水酸化カリウム溶液で室温での攪拌下、速やかに滴定して末端基定量による数平均分子量を次式で算出した。

末端基定量による数平均分子量 = $20,000 A/B$

A: 生体内分解性ポリマーの質量 (g)

B: 滴定終点までに添加した 0.05 N アルコール性水酸化カリウム溶液 (ml)

例えば、1種類以上の α -ヒドロキシ酸類から無触媒脱水重縮合法で合成され、末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体では、GPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致する。これに対し、環状二量体から触媒を用いて開環重合法で合成され、末端に遊離カルボキシル基を本質的には有しない重合体では、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量を大きく上回る。この相違によって末端に遊離のカルボキシル基を有する重合体は末端に遊離カルボキシル基を有しない重合体と明確に区別することができる。

【0019】末端基定量による数平均分子量が絶対値であるのに対してGPC測定による数平均分子量は各種分析、解析条件(例えば移動相の種類、カラムの種類、基準物質、スライス幅の選択、ベースラインの選択等)に

よって変動する相対値であるため、一義的な数値化は困難であるが、例えばGPC測定による数平均分子量と末端基定量による数平均分子量とがほぼ一致するとは、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約0.5倍ないし約2倍の範囲内であることをいう。好ましくは、約0.8倍ないし約1.5倍の範囲内であることをいう。また、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量を大きく上回るとは、末端基定量による数平均分子量がGPC測定による数平均分子量の約2倍を超える場合をいう。

【0020】本発明の徐放性製剤は、生理活性物質と水溶性多価金属塩とを混合して得られる生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩を生体内分解性ポリマーに分散または溶解させることによって製造される。徐放性製剤の製造法としては、例えば水中乾燥法、相分離法、噴霧乾燥法あるいはこれらに準ずる方法などが挙げられる。以下に、徐放性製剤として、例えばマイクロカプセルを製造する場合の製造方法について記述する。

【0021】(イ) 水中乾燥法(o/w法)

本方法においては、まず生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液を作製する。本発明の徐放性製剤の製造の際に使用する有機溶媒は、沸点が120℃以下であることが好ましい。該有機溶媒としては、例えばハロゲン化炭化水素(例、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等)、アルコール類(エタノール、メタノール)、アセトニトリル等が挙げられる。これらは適宜の割合で混合して用いてもよい。有機溶媒は、好ましくはジクロロメタン、アセトニトリルである。有機溶媒は、特に好ましくはジクロロメタンである。生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中の濃度は、生体内分解性ポリマーの分子量、有機溶媒の種類などによって異なるが、一般的には約0.01ないし約80%(w/w)から選ばれる。さらに好ましくは約0.1ないし約70%(w/w)、特に好ましくは約1ないし約60%である。このようにして得られた生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中に、生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩を、必要により凍結乾燥あるいは真空乾燥した後、添加し、溶解させる。この際、複合体の添加量は、複合体：生体内分解性ポリマーの重量比の上限が約1：2まで、好ましくは約1：3までとなるようにする。ついで、このようにして調製された有機溶媒溶液をさらに水相中に加えて、タービン型攪拌機などを用いてo/wエマルジョンを形成させた後、油相溶媒を蒸発させ、マイクロカプセルを製造する。この際の水相体積は一般的には油相体積の約1倍ないし約10,000倍から選ばれる。さらに好ましくは、約2倍ないし約5,000倍から選ばれる。特に好ましくは、約5倍ないし約2,000倍から選ばれる。上記外水相中に乳化剤を加えてもよい。該乳化剤は、一般的に安定なo/wエマルジョンを形成できるものであれば何れでもよい。乳化剤としては、例えば

アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、レシチン、ゼラチン、ヒアルロン酸などが挙げられる。これらは適宜組み合わせ使用してもよい。外水相中の乳化剤の濃度は、好ましくは約0.001%ないし20%(w/w)である。さらに好ましくは約0.01%ないし10%(w/w)、特に好ましくは約0.05%ないし5%(w/w)である。上記したo/w法においては、複合体を生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中に分散させる方法、すなわちs/o/w法によりマイクロカプセルを製造してもよい。

【0022】(ロ) 水中乾燥法(w/o/w法)

本方法においては、まず生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液を製造する。この際、生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液中の濃度は、生体内分解性ポリマーの分子量、有機溶媒の種類などによって異なるが、一般的には約0.01ないし約80%(w/w)から選ばれる。さらに好ましくは約0.1ないし約70%(w/w)、特に好ましくは約1ないし約60%である。内水相として複合体の水分散液を使用する。複合体の水分散液中の濃度は、例えば約10%(w/v)ないし約90%(w/v)である。上記した複合体の水分散液を生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液に乳化、分散し、w/oエマルジョンを製造する。乳化操作は、公知の分散方法により行われる。乳化操作は、例えばタービン型攪拌機、ホモジナイザー等を用いて行われる。この際、内水相と生体内分解性ポリマーの重量比の上限が約1：2まで、好ましくは約1：3までとなるようにする。内水相と生体内分解性ポリマーの有機溶媒溶液との比率は1：1, 000(v/v)ないし1：1(v/v)、好ましくは1：100(v/v)ないし1：5(v/v)、特に好ましくは1：50(v/v)ないし1：5(v/v)である。ついでこのようにして製造されたw/oエマルジョンをさらに水相中に加えて、w/o/wエマルジョンを製造し、油相溶媒を蒸発させマイクロカプセルを製造する。具体的操作は上記(イ)に準ずる。

【0023】本発明で用いられる徐放性製剤は微粒子状であることが好ましい。なぜならば徐放性製剤は、通常の皮下あるいは筋肉内注射に使用される注射針を通して投与される方が、患者に対し過度の苦痛を与えることがないからである。該徐放性製剤の粒子径は、例えば平均粒子径として約0.1ないし300μm、好ましくは約1ないし150μm、特に好ましくは約2ないし100μmである。本明細書中、微粒子状の徐放性製剤を、マイクロカプセルと称することもある。マイクロカプセルはマイクロスフィアと称することもある。

【0024】本発明の徐放性製剤は、例えばマイクロカプセルとして、あるいはマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化し、非経口剤(例、筋肉内、皮

下、臓器などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤等)、経口剤(例、カプセル剤(例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等)、顆粒剤、散剤等の固形製剤、懸濁剤等の液剤等)などとして投与することができる。本発明において、徐放性製剤は特に注射用であることが好ましい。例えば、徐放性製剤がマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルを分散剤(例、Tween 80、HCO-60等の界面活性剤、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸等の多糖類など)、保存剤(例、メチルパラベン、プロピルパラベンなど)、等張化剤(例、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖など)等と共に水性懸濁剤とすることにより実用的な注射用徐放製剤が得られる。また、ゴマ油、コーン油などの植物油あるいはこれにレシチンなどのりん脂質を混合したもの、あるいは中鎖脂肪酸トリグリセリド(例、ミグリオール 812)と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。

【0025】徐放性製剤が例えばマイクロカプセルである場合、マイクロカプセルの粒子径は、懸濁注射剤として使用する場合にはその分散度、通針性を満足する範囲であればよく、例えば平均粒子径として約0.1ないし約300 μ mの範囲が挙げられる。粒子径は、好ましくは約1ないし約150 μ m、特に好ましくは約2ないし約100 μ mの範囲である。上記したマイクロカプセルを無菌製剤にするには、製造全工程を無菌にする方法、ガンマ線で滅菌する方法、防腐剤を添加する方法等が挙げられるが、特に限定されない。

【0026】本発明の徐放性製剤は、低毒性で哺乳動物(例、ヒト、牛、豚、犬、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等)に対して安全に用いることができる。本発明の徐放性製剤の適応は、使用する生理活性物質により異なる。本発明の徐放性製剤は、生理活性物質が例えばインスリンである場合には糖尿病などの治療または予防に、インターフェロンアルファである場合には腎癌、C型肝炎などの治療または予防に、エリスロポエチンである場合には貧血などの治療または予防に、成長ホルモンである場合には発育不全などの治療または予防に、顆粒球コロニー刺激因子である場合には癌化学療法後の好中球減少症などの治療または予防に有効である。また、生理活性物質がエリスロポエチンである場合、本発明の徐放性製剤は、自己血輸血のための造血促進にも有効である。徐放性製剤の投与量は、生理活性物質の種類と含量、放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって種々異なるが、生理活性物質の有効量であればよい。該生理活性物質の1回当たりの投与量としては、例えば徐放性製剤が1週間型製剤である場合、好ましくは、成人1人、約0.0001ないし10mq/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは約0.0005ないし1mq/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。徐放性製剤の投

与量は、成人1人、1回当たり好ましくは、約0.0005ないし50mq/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。さらに好ましくは約0.0025ないし10mq/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、1週間に1回、2週間に1回、4週間に1回等、生理活性物質の種類と含量、剤型、放出の持続時間、対象疾病、対象動物などによって適宜選ぶことができる。本発明の製剤の保存は常温あるいは冷所に保存されるが、好ましくは冷所である。ここでいう常温あるいは冷所とは日本薬局方において定義されるものである。すなわち、常温とは15ないし25 $^{\circ}$ Cを、冷所とは15 $^{\circ}$ C以下を意味する。

【0027】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

参考例1

0.5gの豚インスリン(27.3U/mg、ディオンズ社、オランダ)を100mM水酸化ナトリウム水溶液22mlに溶解させた溶液と、1gの酢酸亜鉛(2水和物)を10mlの蒸留水に溶解させた溶液を混合し、室温で1時間放置した。約3,000rpmで遠心分離操作を行ない(05PR-22、日立製作所)上清を捨てた。これを再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行った。上清を捨てた後、少量の蒸留水を加えて凍結乾燥し、約1gの粗豚インスリン酢鉛塩を乾燥粉末として得た。得られた粉末中のインスリン含量を調べるため、30%アセトニトリルを含有する50mMのEDTA溶液で3時間振とうして抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定量した。その結果、乾燥粉末100mgあたり豚インスリンを47.6mg含有していた。

【0028】参考例2

40%水酸化カリウム水溶液168mlとエチルエーテル1,000mlの混液に氷冷攪拌下、ニトロソエチル尿素104gを少しずつ加えた。生じた黄色のエーテル層を分液し、粒状の水酸化カリウムを加え乾燥した。ついで水酸化カリウムを除去し、ジアゾエタン溶液約900mlを得た。重量平均分子量約5,800の乳酸-グリコール酸共重合体(乳酸/グリコール酸=50/50(モル/モル%))、130gを塩化メチレン1,900mlに溶解し、攪拌冷却した。氷冷下、上記したジアゾエタン溶液を滴下し、その後室温下2時間攪拌した。一夜放置後、溶媒を減圧留去し、残留物を室温で真空乾燥することにより、乳酸-グリコール酸共重合体のエチルエステル131gを得た。

【0029】参考例3

1mgのヒト成長ホルモン(バイオテクノロジー・ジェネラル社、米国)を0.9mlの蒸留水に溶解した溶液に、9.98、29.43、49.88、69.84、79.81または99.77 μ gの酢酸亜鉛(二水和物)を100 μ lの蒸留水に溶解した水溶液を混合し

た。亜鉛／成長ホルモンのモル比はそれぞれ1、3、5、7、8、10である。このモル比が5の時には成長ホルモンの約60％が沈殿し、7以上ではほぼ100％の成長ホルモンが沈殿した。

【0030】実施例1

インターフェロンアルファ水溶液200ml（400億国際単位を含有）に酢酸亜鉛（2水和物）水溶液1ml（200mg/ml）と1規定水酸化ナトリウム1mlを加えて、混合後4℃にて一晩静置した。3,000rpmで遠心分離後、不溶性の複合体を回収し、凍結乾燥して、約200mgの粗インターフェロンアルファ亜鉛塩を得た。乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸比＝50/50、分子量5800、和光純薬製）1.5gと参考例2で得られた乳酸－グリコール酸共重合体のエチルエステル1.5gをジクロロメタン4mlに溶解した溶液に、前記した粗インターフェロンアルファ亜鉛塩200mgを添加し、ホモジナイザー（ポリトロン）で約30秒間攪拌し、s/oエマルションを得た。得られたs/oエマルションを予め18℃に調節しておいた0.1％（w/w）ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液700ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、6,000rpmでs/o/wエマルションとした。このs/o/wエマルションを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた。ついで、約2,000rpmで遠心分離操作を行ない（05PR-22、日立製作所）上清を捨てた。得られる残渣を再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行った。捕集されたマイクロカプセルにD－マンニトール50mgを加え、さらに少量の蒸留水を加えて再分散した後、この分散液を凍結乾燥して粉末状のマイクロカプセルを得た。

【0031】実施例2

乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸＝75/25（モル／モル％）、重量平均分子量13,585、数平均分子量4,413、和光純薬工業製）3.6gにジクロロメタン6.6g（5ml）を加えて溶解した。また参考例1で得られた粗豚インスリン亜鉛塩420mg（豚インスリンを200mg含有）をジクロロメタン6.6g（5ml）に分散し、両者を混合した後、ホモジナイザー（ポリトロン）で約10秒間攪拌し、s/oエマルションを得た。得られたs/oエマルションを予め18℃に調節しておいた0.1％（w/w）ポリビニルアルコール（EG-40、日本合成化学製）水溶液800ml中に注入し、タービン型ホモミキサーを用い、6,000rpmでs/o/wエマルションとした。このs/o/wエマルションを室温で3時間攪拌してジクロロメタンを揮散させ、油相を固化させた。ついで、約2,000rpmで遠心分離操作を行ない（05PR-22、日立製作所）上清を捨てた。得られる残渣を再び蒸留水に分散後、さらに遠心分離を行った。捕集された

マイクロカプセルにD－マンニトール50mgを加え、さらに少量の蒸留水を加えて再分散した後、この分散液を凍結乾燥して粉末状のマイクロカプセルを得た（約3グラム回収）。得られたマイクロカプセル中のインスリン含量を調べるため、30％アセトニトリルを含有する50mMのEDTA溶液で3時間振とうして抽出し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量した。その結果、マイクロカプセル100mgあたりインスリンを6.2mg含有していた。

10 【0032】実施例3

エリスロポエチン注射液（エスポーTM注射液3000、三共株式会社製）8ml（12000国際単位を含有）に塩化亜鉛1gを少量ずつ加え、室温で1時間放置した。得られる混合液を3,000rpmで遠心分離し、沈殿物を蒸留水に再度分散したのち、さらに遠心分離により沈殿物を得た。該沈殿物に少量の蒸留水を加えて凍結乾燥し、粗エリスロポエチン亜鉛塩と粗アルブミン亜鉛塩との混合物60mgを粉末として得た。乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸比＝50/50、分子量14000、和光純薬製）0.5gをジクロロメタン1.5mlに溶解した溶液に、前記した粗エリスロポエチン亜鉛塩と粗アルブミン亜鉛塩との混合物60mgを添加し、ホモジナイザー（ポリトロン）で約30秒間攪拌しs/oエマルションを得た。ついで、実施例1と同様にして粉末状のマイクロカプセル152mgを得た。

【0033】実施例4

30 ヒト成長ホルモン（ジェントロピンTM16IU、住友製薬株式会社製）を蒸留水1mlに溶解し、さらに塩化亜鉛水溶液（10mg/ml）100μlを加え、室温で1時間放置した。得られる混合液を遠心分離し、沈殿物を蒸留水に再度分散したのち、さらに遠心分離により沈殿物を得た。該沈殿物に少量の蒸留水を加えて凍結乾燥し、粗ヒト成長ホルモン亜鉛塩5.6mgを粉末として得た。乳酸－グリコール酸共重合体（乳酸／グリコール酸比＝75/25、分子量9,800、和光純薬製）0.5gをジクロロメタン1.5mlに溶解した溶液に、前記した粗ヒト成長ホルモン亜鉛塩5.6mgを添加し、ホモジナイザー（ポリトロン）で約30秒間攪拌しs/oエマルションを得た。ついで、実施例1と同様にして粉末状のマイクロカプセル121mgを得た。

【0034】実施例5

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）注射液〔フィルグラスチンノイボーゲン（Filgrastin Neupogen）（商品名）、アムジェン社、米国）10ml（3×10⁶国際単位を含有）を希水酸化ナトリウム水溶液で中性にしたのち、塩化亜鉛水溶液（10mg/ml）1mlを加え、室温で1時間放置した。得られる混合液を遠心分離し、沈殿物を蒸留水に再度分散したのち、さらに遠心分離により沈殿物を得た。該沈殿物に少量の蒸留水を

加えて凍結乾燥し、粗顆粒球コロニー刺激因子亜鉛塩4 mgを粉末として得た。乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸比=50/50、分子量8,000、和光純薬製）0.5 gをジクロロメタン1.5 mlに溶解した溶液に、前記した粗顆粒球コロニー刺激因子亜鉛塩4 mgを添加し、ホモジナイザー（ポリトロン）で約30秒間攪拌しs/oエマルションを得た。ついで、実施例1と同様にして粉末状のマイクロカプセル110 mgを得た。

【0035】実施例6

ヒトインスリン（ヒト組換え体インスリン、和光純薬製）5.21 mg（26 U/mg）を57 mM塩酸水溶液0.63 mlに溶解した後、0.05 N水酸化ナトリウム水溶液0.35 mlを加えて、pHが中性付近のヒトインスリン溶液を得た。該ヒトインスリン溶液に酢酸亜鉛水溶液（20 mg/ml）0.2 mlを加え、4℃で1晩放置した。得られる混合液を約3,000 rpmで遠心分離し、沈殿物を蒸留水に再度分散したのち、さらに遠心分離により沈殿物を得た。該沈殿物に少量の蒸留水を加えて凍結乾燥し、粗ヒトインスリン亜鉛塩11 mgを粉末として得た。乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸比=50/50、分子量6,000、和光純薬製）0.5 gをジクロロメタン1.5 mlに溶解した溶液に、前記した粗ヒトインスリン亜鉛塩11 mgを添加し、ホモジナイザー（ポリトロン）で約30秒間攪拌しs/oエマルションを得た。ついで、実施例1と同様にして粉末状のマイクロカプセル105 mgを得た。

【0036】比較例

乳酸-グリコール酸共重合体（乳酸/グリコール酸比=50/50、分子量6,000、和光純薬製）0.9 gをジクロロメタン1.5 mlに溶解した。この溶液に亜鉛をほとんど含まないヒトインスリン100 mg（亜鉛含量0.0001%（w/w）以下）を添加し、ボルトックスミキサーにて混合後、ホモジナイザー（ポリトロン）で約10秒間攪拌しs/oエマルションを得た。ついで、実施例1と同様にして粉末状のマイクロカプセル470 mgを得た。得られたマイクロカプセル中のインスリン含量を調べるため、30%アセトニトリルを含有する50 mMのEDTA溶液で3時間振とうして抽出し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量した。その*

*結果、マイクロカプセル100 mgあたりインスリンを8.7 mg含有していた。

【0037】実験例1

実施例2で得られた粉末状のマイクロカプセル323 mgを注射用分散媒（蒸留水1 mlあたり5 mgのカルボキシメチルセルロース、1 mgのポリソルベート80、50 mgのマンニトールを溶解したもの）1 mlに分散し、6週令の雄性SD系ラットの背部に皮下投与した（インスリン投与量：一匹あたり約20 mg）。投与後、経時的に尾部より採血し、血清中の豚インスリン濃度を酵素免疫学的手法（EIA）（三光純薬製）で測定した。その結果、投与後1週間以上、血清中に活性を持つ豚インスリンが検出された。

【0038】実験例2

実施例4で得られたマイクロカプセル70 mgを注射用分散媒（5 gのカルボキシメチルセルロース、2 gのポリソルベート80および50 gのマンニトールを蒸留水1 Lに溶解した溶液）0.5 mlに分散して、6週齢雄性SDラットの背部に皮下投与した（成長ホルモン投与量：一匹あたり約3 mg）。投与後、経時的に尾部より採血し、血清中の成長ホルモン濃度をラジオイムノアッセイ（RIA）で測定した。その結果、投与後1週間以上、血清中に活性を持つ成長ホルモンが検出された。

【0039】比較実験例

比較例で得られた粉末状のマイクロカプセル154.7 mgを注射用分散媒（蒸留水1 mlあたり5 mgのカルボキシメチルセルロース、1 mgのポリソルベート80、50 mgのマンニトールを溶解したもの）1.75 mlに分散し、6週令の雄性SD系ラットの背部皮下投与した（インスリン投与量：一匹あたり約44 mg）。投与後、経時的に尾部より採血し、血清中のヒトインスリン濃度を酵素免疫学的手法（EIA）で測定した。その結果、投与後1日目以降は、血清中にインスリンは、ほとんど検出されなかった。

【0040】

【発明の効果】本発明によれば、生理活性物質の封入効率を高め、投与後初期の漏出を抑制した徐放性製剤が得られる。また、本発明の徐放性製剤は、生体内投与後に生理活性物質の生物活性を保持したまま徐放できる。さらに、徐放性製剤中の生理活性物質が長期間にわたって安定に保たれ、生物活性の損失が少ない。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 37/395
47/02

識別記号

庁内整理番号

F I

A61K 37/24
37/465
37/48

技術表示箇所

(11)

特開平8-217691

(72)発明者 岡田 弘晃
大阪府吹田市山田南44番11-704号

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-217691

(43)Date of publication of application : 27.08.1996

(51)Int.Cl.

A61K 38/00

A61K 9/52

A61K 38/22

A61K 38/43

A61K 39/00

A61K 39/395

A61K 47/02

(21)Application number : 07-230841

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 08.09.1995

(72)Inventor : IGARI YASUTAKA
YAMAGATA YUTAKA
IINUMA SATOSHI
OKADA HIROAKI

(30)Priority

Priority number : 06216449
06310291Priority date : 09.09.1994
14.12.1994

Priority country : JP

JP

(54) SUSTAINED RELEASE PREPARATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject preparation having raised sealing efficiency of a physiologically active substance, suppressed leakage at an early stage after administration, keeping the physiologically active substance stably for a long period of time and causing slight loss of the physiologically active substance.

CONSTITUTION: This preparation comprises (A) a water-insoluble or a slightly water-soluble polyvalent metal salt of a water-soluble peptide physiologically active substance except endothelin antagonist and (B) a polymer degradable in vivo. The physiologically active substance preferably contains a water-soluble peptide or its derivative, especially a hormone (growth hormone or insulin) cytokinin (interferon) or a growth factor. The polyvalent metal salt is preferably a transition metal salt or a zinc salt and has about 0-0.1 (w/w) water solubility. The preparation contains about 0.1-50wt.% of the salt. The component B is preferably an aliphatic polyester [lactic acid and glycol (composition ratio of 100/0-400/60)].

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

13.08.2002

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The sustained release drug which comes to contain the water-insoluble nature or the water poorly soluble polyvalent metallic salt, and the biodegradation nature polymer of a water-soluble peptide sex physiology active substance except an endothelin antagonist.

[Claim 2] The sustained release drug according to claim 1 whose physiological active substance is a water-soluble peptide or its derivative.

[Claim 3] The sustained release drug according to claim 2 whose peptide is hormone, cytokine, a blood-making factor, a growth factor, an enzyme, fusibility or a solubilization acceptor, an antibody, a peptide nature antigen, a blood coagulation factor, or an adhesion factor.

[Claim 4] The sustained release drug according to claim 1 whose physiological active substance is hormone.

[Claim 5] The sustained release drug according to claim 4 whose hormone is a growth hormone.

[Claim 6] The sustained release drug according to claim 4 whose hormone is an insulin.

[Claim 7] The sustained release drug according to claim 1 whose physiological active substance is cytokine.

[Claim 8] The sustained release drug according to claim 7 whose cytokine is interferon.

[Claim 9] The sustained release drug according to claim 1 whose physiological active substance is a growth factor.

[Claim 10] The sustained release drug according to claim 1 whose polyvalent metallic salt is a transition-metals salt.

[Claim 11] The sustained release drug according to claim 1 whose polyvalent metallic salt is zinc salt.

[Claim 12] The sustained release drug according to claim 1 whose solubility to the water of polyvalent metallic salt is about 0 thru/or about 0.1% (w/w).

[Claim 13] They are about 0.1 thru/or the sustained release drug according to claim 1 which comes to carry out content about 50% (w/w) about polyvalent metallic salt.

[Claim 14] The sustained release drug according to claim 1 whose biodegradation nature polymer is aliphatic series polyester.

[Claim 15] The sustained release drug according to claim 14 whose aliphatic series polyester is the polymer of a lactic acid and a glycolic acid.

[Claim 16] The sustained release drug according to claim 15 whose presentation ratio (a mol / mol %) of a lactic acid and a glycolic acid is about 40 [100/0 thru/or]/60.

[Claim 17] The sustained release drug according to claim 15 whose weight average molecular weight of a polymer is about 3,000 thru/or about 20,000.

[Claim 18] The sustained release drug according to claim 14 whose aliphatic series polyester is the homopolymerization object of a lactic acid.

[Claim 19] The sustained release drug according to claim 18 whose weight average molecular weight of a homopolymerization object is about 3,000 thru/or about 20,000.

[Claim 20] The sustained release drug according to claim 1 which is a microcapsule.

[Claim 21] The sustained release drug according to claim 20 whose microcapsule is an object for injection.

[Claim 22] The sustained release drug according to claim 1 which is an object for injection.

[Claim 23] Use of the water-insoluble nature of the water-soluble peptide sex physiology active substance except the endothelin antagonist for manufacture of a sustained release drug or water poorly soluble polyvalent metallic salt, and a biodegradation nature polymer.

[Claim 24] The manufacturing method of the sustained release drug characterized by giving the s/o/w mold emulsion which distributed the water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a water-soluble peptide sex physiology active substance except an endothelin antagonist to the oil phase containing a biodegradation nature polymer, prepared the s/o mold emulsion, added the obtained s/o mold emulsion to the aqueous phase, prepared the s/o/w mold emulsion, and was subsequently obtained to underwater desiccation.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the sustained release drug which comes to contain the water-insoluble nature or the water poorly soluble polyvalent metallic salt, and the biodegradation nature polymer of a water-soluble peptide sex physiology active substance except an endothelin antagonist.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is known that various pharmacological actions are shown in a living body, among these a physiological active substance especially a peptide, or its derivative is made to produce in large quantities using living bodies, such as Escherichia coli, yeast, an animal cell, or a hamster, by development of the technique of chemosynthesis or gene engineering, and a cell technology about some, and application as drugs is achieved. However, generally, since the half-life in the living body is short, these peptides need a frequent administration, and a patient's corporal burden accompanying injection has some which cannot be disregarded. In order to solve this problem, the various attempts in which a sustained release drug is developed are made. How the 1st trouble when developing the sustained release drug of a water-soluble physiological active substance, especially a water-soluble peptide (a peptide may only be called below) controls the solubility of a peptide occurs. That is, it is controlling the emission rate of a peptide. Insoluble zinc-protamine-alpha-interferon complex is indicated by Patent Publication Heisei No. 500286 [three to]. Moreover, the system which made the poly lactide distribute a macromolecule polypeptide is indicated by JP,63-2930,A. A water-soluble peptide is changed into the peptide salt of water-insoluble nature at JP,5-221855,A and JP,6-172208,A, and the technique of making a minute ball incorporating a water-soluble peptide efficiently is indicated by suspending to the organic medium containing a biodegradation nature giant-molecule polymerization object. The water-insoluble nature peptide used in this official report is an organic-acid salt to the basic section inside a water-soluble peptide molecule, and is the pamoate, a tannic acid, stearin acid, or palmitate.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although the various attempts in which the sustained release drug of a water-soluble physiological active substance is manufactured as mentioned above are made, there is nothing that can still be satisfied, and the enclosure effectiveness of a water-soluble physiological active substance is high, exsorption of the water-soluble physiological active substance in early stages of after administration is controlled, a water-soluble physiological active substance emission rate is fixed, and, moreover, development of a sustained release drug with a water-soluble stable physiological active substance is desired.

[0004]

[Means for Solving the Problem] The place which inquired wholeheartedly in order that this invention persons might solve the above-mentioned trouble, A water-soluble peptide sex physiology active substance with the acidic group except an endothelin antagonist, or its water-soluble salt the water of the physiological active substance generated from (a physiological active substance may only be called hereafter) and water-soluble polyvalent metallic salt --

insoluble -- or water poorly soluble polyvalent metallic salt By manufacturing (complex may only be called hereafter) and making a biodegradation nature polymer distribute this, the incorporation effectiveness to the inside of the biodegradation nature polymer of a physiological active substance rose by leaps and bounds, and it found out that a sustained release drug also with little exsorption of the drug immediately after administration was got by the living body. This invention was completed as a result of inquiring further based on this knowledge. Namely, the sustained release drug with which this invention comes to contain the water-insoluble nature or the water poorly soluble polyvalent metallic salt, and the biodegradation nature polymer of a water-soluble peptide sex physiology active substance except (1) endothelin antagonist, (2) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose physiological active substance is a water-soluble peptide or its derivative, (3) A peptide Hormone, cytokine, a blood-making factor, a growth factor, an enzyme, The sustained release drug of the aforementioned (2) publication which is fusibility or a solubilization acceptor, an antibody, a peptide nature antigen, a blood coagulation factor, or an adhesion factor, (4) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose physiological active substance is hormone, (5) The sustained release drug of the aforementioned (4) publication whose hormone is a growth hormone, (6) The sustained release drug of the aforementioned (4) publication whose hormone is an insulin, the sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose (7) physiological active substances are cytokine, (8) The sustained release drug of the aforementioned (7) publication whose cytokine is interferon, (9) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose physiological active substance is a growth factor, (10) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose polyvalent metallic salt is a transition-metals salt, (11) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose polyvalent metallic salt is zinc salt, the sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose solubility to the water of (12) polyvalent metallic salt is about 0 thru/or about 0.1% (w/w) at 20 degrees C, (13) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose solubility to the water of polyvalent metallic salt is about 0 thru/or about 0.01% (w/w), (14) Polyvalent metallic salt About 0.1 thru/or the sustained release drug of the aforementioned (1) publication which comes to carry out content about 50% (w/w), (15) Polyvalent metallic salt About 0.1 thru/or the sustained release drug of the aforementioned (1) publication which comes to carry out content about 30% (w/w), (16) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication whose biodegradation nature polymer is aliphatic series polyester, (17) The sustained release drug of the aforementioned (16) publication whose aliphatic series polyester is the polymer of a lactic acid and a glycolic acid, (18) The sustained release drug of the aforementioned (17) publication whose presentation ratio (a mol / mol %) of a lactic acid and a glycolic acid is about 40 [100/0 thru/or]/60, (19) The sustained release drug of the aforementioned (18) publication whose presentation ratio (a mol / mol %) is about 45 [about 90/10 thru/or]/55, (20) The sustained release drug of the aforementioned (17) publication whose weight average molecular weight of a polymer is about 3,000 thru/or about 20,000, (21) The sustained release drug of the aforementioned (17) publication whose weight average molecular weight of a polymer is about 3,000 thru/or about 14,000, (22) The sustained release drug of the aforementioned (16) publication whose aliphatic series polyester is the homopolymerization object of a lactic acid, (23) The sustained release drug of the aforementioned (22) publication whose weight average molecular weight of a homopolymerization object is about 3,000 thru/or about 20,000, (24) The sustained release drug of the aforementioned (22) publication whose weight average molecular weight of a homopolymerization object is about 3,000 thru/or about 14,000, (25) The sustained release drug of the aforementioned (1) publication which is a microcapsule, the sustained release drug of the aforementioned (25) publication whose (26) microcapsules are the objects for injection, (27) Use of the water-insoluble nature of the water-soluble peptide sex physiology active substance except the endothelin antagonist for manufacture of the sustained release drug of the aforementioned (1) publication which is an object for injection, and (28) sustained release drugs or water poorly soluble polyvalent metallic salt, and a biodegradation nature polymer, And distribute the water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a water-

soluble peptide sex physiology active substance except (29) endothelin antagonist to the oil phase containing a biodegradation nature polymer, and a s/o mold emulsion is prepared. A s/o mold emulsion is added to the aqueous phase, a s/o/w mold emulsion is prepared, and it is related with the manufacturing method of the sustained release drug characterized by subsequently to underwater desiccation attaching a s/o/w mold emulsion.

[0005]

[Embodiment of the Invention] It is IUPAC-IUB when displaying by the cable address about amino acid, a peptide, etc. in this specification. When an optical isomer may be in amino acid based on the cable address by the commission-on biochemical nomenclature (Commission on Biochemical Nomenclature), or the common use cable address in the field concerned, L bodies shall be shown if not shown especially clearly. The physiological active substance in the water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a physiological active substance is a physiological active substance with an acidic group. In here, a carboxyl group, a sulfonic group, etc. are mentioned as an acidic group, for example. A physiological active substance is a physiological active substance which contains amino acid in intramolecular with peptide linkage, and has an acidic group in it preferably. This acidic group may originate in amino acid. A physiological active substance is the peptide which has an acidic group still more preferably, or its derivative. Solubility [as opposed to / in a physiological active substance / water at 25 degrees C of a physiological active substance] is more than 1% (w/w).

[0006] As for a physiological active substance, it is desirable to have two or more carboxyl groups, the molecular weight of a physiological active substance -- about 200 thru/or about 200,000 -- desirable -- about 200 thru/or about 50,000 -- it is molecular weight 500 [about] thru/or about 40,000 still more preferably. A hormone action is mentioned as a thing typical as activity of a physiological active substance. Moreover, any of a natural product, a compost, a semisynthesis object, and the product of gene engineering are sufficient as this physiological active substance, and these derivatives are further sufficient as it. Any of actuation nature or antagonism nature are sufficient as the operation mechanism of these physiological active substances. As the physiological active substance of this invention especially a water-soluble peptide, or its derivative, agonist or an antagonist etc. which can be combined with the acceptor of hormone, cytokine, a hematogenous factor, a growth factor, an enzyme, fusibility or a solubilization acceptor, an antibody or its fragmentation, a peptide nature antigen, a blood coagulation factor, an adhesion factor, or this physiological active substance, for example is mentioned.

[0007] As hormone, an insulin, a growth hormone, a natriuresis peptide, gastrin, prolactin, adrenocorticotrophin (ACTH), thyrotropic hormone (TSH), luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), Homo sapiens chorionic gonadotropin (HCG), motilin, kallikrein, etc. are mentioned, for example. Hormone is an insulin and a growth hormone preferably.

[0008] As cytokine, lymphokine, a monokine, etc. are mentioned, for example. As lymphokine, interferon (alpha, a beta, gamma), interleukin (IL-2 thru/or IL-12), etc. are mentioned, for example. As a monokine, interleukin 1 (IL-1), a tumor necrosis factor, etc. are mentioned, for example. Cytokine is lymphokine preferably and is interferon (alpha, a beta, gamma) still more preferably. As a hematogenous factor, erythropoietin, a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), a macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin, a platelet growth stimulator, megger karyocyte POTENSHIETA, etc. are mentioned, for example. As a growth factor, basic or acid fibroblast growth factors (FGF) or these families (an example, FGF-9, etc.), nerve cell growth factors (NGF) or these families, insulin-like growth factors (an example, IGF-1, IGF-2, etc.), the factors (BMP) that participate in bone growth, or these families are mentioned, for example. As an enzyme, superoxide DISUMYUTAZE (SOD), a tissue plasminogen activator (TPA), etc. are mentioned, for example. As a fusibility acceptor, fusibility interleukin 6 (IL-6) acceptor, insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), a fusibility tumor necrosis factor acceptor, a fusibility epidermal growth factor acceptor, a fusibility interleukin 1 acceptor, etc. are mentioned. What solubilized a well-known acceptor, for example, an interleukin 1 acceptor, interleukin 6 acceptor, a tumor necrosis factor acceptor, FASU (Fas) ligand, etc. by the gene engineering-technique as a solubilization acceptor is mentioned. As an antibody, a Homo sapiens

mono-KUNARU antibody, the Homo sapiens-mouse chimera monoclonal antibody which consists of a variant part of the mouse origin and a constant region of the Homo sapiens origin are mentioned, for example. As a type of an antibody, IgM, IgG, IgE, etc. are mentioned, for example. As an antigen, what is recognized, for example by said antibody is mentioned, and a platelet, a virus, etc. are mentioned further. As a blood coagulation factor, factor VIII etc. is mentioned, for example. Fibronectin, ICAM-1, etc. are mentioned as an adhesion factor. As a physiological active substance, endothelin, Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide (PACAP), etc. are mentioned further.

[0009] A physiological active substance is changed into the water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a physiological active substance by making water-soluble polyvalent metallic salt contact. As polyvalent metal in water-soluble polyvalent metallic salt, the metal of II **, III **, or IV ** is mentioned, for example, and alkaline earth metal (an example, calcium, magnesium, etc.), transition metals [iron (II **, III **), copper (II **), zinc (II **), etc.], an IIb group metal [aluminum (II **, III **) etc.], an IVb group metal [tin (II **, IV **) etc.], etc. are specifically mentioned. polyvalent metal -- desirable -- alkaline earth metal or transition metals -- further -- desirable -- zinc or calcium -- it is zinc especially preferably. As water-soluble polyvalent metallic salt, the salt of polyvalent metal and an acid, for example, the salt of polyvalent metal and an inorganic acid, and the salt of polyvalent metal and an organic acid are mentioned. solubility [as opposed to / the salt of polyvalent metal and an acid is desirable and / water at ordinary temperature (20 degrees C)] -- salt about 20mg [/ml] or more -- further -- desirable -- solubility -- salt about 100mg [/ml] or more -- solubility is salt about 200mg [/ml] or more especially preferably. As an inorganic acid in the salt of polyvalent metal and an inorganic acid, a hydrochloric acid, a sulfuric acid, a nitric acid, and thiocyanic acid are mentioned, for example. As an organic acid in the salt of polyvalent metal and an organic acid, aliphatic carboxylic acid and an aromatic series acid are mentioned, for example. Aliphatic carboxylic acid is a carbon number 2 thru/or aliphatic carboxylic acid of 9 preferably. As aliphatic carboxylic acid, aliphatic series monocarboxylic acid, aliphatic series dicarboxylic acid, aliphatic series tricarboxylic acid, etc. are mentioned, for example. These aliphatic carboxylic acid may be any of saturation or partial saturation.

[0010] As aliphatic series monocarboxylic acid, a carbon number 2 thru/or the saturation aliphatic series monocarboxylic acid (an example, an acetic acid, a propionic acid, butanoic acid, a valeric acid, a caproic acid, enanthic acid, a caprylic acid, pelargonic acid, capric acid, etc.) of 9 and a carbon number 2 thru/or the partial saturation aliphatic series monocarboxylic acid (an example, an acrylic acid, a PUROI all acid, a methacrylic acid, a crotonic acid, isocrotonic acid, etc.) of 9 are mentioned, for example. As aliphatic series dicarboxylic acid, a carbon number 2 thru/or the saturation aliphatic series dicarboxylic acid (an example, a malonic acid, a succinic acid, a glutaric acid, an adipic acid, pimelic acid, etc.) of 9 and a carbon number 2 thru/or the partial saturation aliphatic series dicarboxylic acid (an example, a maleic acid, a fumaric acid, a citraconic acid, mesaconic acid, etc.) of 9 are mentioned, for example. As aliphatic series tricarboxylic acid, a carbon number 2 thru/or the saturation aliphatic series tricarboxylic acid (an example, tricarballic acid, 1 and 2, 3-butane tricarboxylic acid, etc.) of 9 are mentioned, for example. The above-mentioned aliphatic carboxylic acid does not have 1, and may have two hydroxyl groups, and a glycolic acid, a lactic acid, a glyceric acid, tartronic acid, a malic acid, a tartaric acid, a citric acid, etc. are mentioned as such an example, for example. Aliphatic carboxylic acid is aliphatic series monocarboxylic acid preferably. aliphatic carboxylic acid -- further -- desirable -- a carbon number 2 thru/or the aliphatic series monocarboxylic acid of 9 -- they are a carbon number 2 thru/or saturation aliphatic series monocarboxylic acid of 3 especially preferably. As a desirable example of aliphatic carboxylic acid, an acetic acid etc. is mentioned especially, for example. As an aromatic series acid, a benzoic acid, a salicylic acid, etc. are mentioned, for example, and it is a benzoic acid preferably.

[0011] If the example of the salt of polyvalent metal and an inorganic acid, i.e., inorganic-acid polyvalent metallic salt, is given, they will be a halogenation salt (an example, a zinc chloride, calcium chloride), a sulfate, a nitrate, a thiocyanate, etc., for example. If the example of the salt of polyvalent metal and aliphatic carboxylic acid, i.e., aliphatic-carboxylic-acid polyvalent metallic

salt, is given, they will be calcium acetate, zinc acetate, calcium propionate, glycolic-acid zinc, a calcium lactate, lactic-acid zinc, and tartaric-acid zinc, for example. If the desirable example of aliphatic-carboxylic-acid polyvalent metallic salt is given, they will be calcium acetate and zinc acetate, for example. It will be zinc acetate etc. if a desirable example is given especially. If the example of the salt of polyvalent metal and an aromatic series acid, i.e., aromatic series acid polyvalent metallic salt, is given, they will be a benzoate, salicylate, etc., for example. It will be zinc benzoate if a desirable example is given especially.

[0012] The water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a physiological active substance is manufactured by mixing a physiological active substance and water-soluble polyvalent metallic salt in a solvent. Mixed actuation is performed underwater preferably. the quantitative ratio at the time of mixing a physiological active substance and water-soluble polyvalent metallic salt underwater (mole ratio) -- 1:1 thru/or 1:1000 -- desirable -- 1:1 thru/or 1:100 -- more -- desirable -- 1:1 thru/or 1:50 -- it is 1:1 thru/or 1:10 especially preferably. [for example,] Moreover, both underwater concentration should just be the concentration more than the solubility of the complex generated by respectively independent solubility within the limits. pH which pH of the water solution at the time of the above-mentioned mixing does not spoil the bioactive of a physiological active substance, and does not lower extremely the solubility of a physiological active substance and each water-soluble polyvalent metallic salt is adopted. Although mixed actuation is usually performed in distilled water, you may carry out by underwater [which was adjusted to the acescence, neutrality, or alkalescence if needed]. The water-insoluble nature or water poor solubility in this invention means that it is not irreversible, and is reversible and the solubility to water is very low. As solubility to water, there is no about 0 in the usual temperature (20 degrees C), and they are about 0 thru/or about 0.01% (w/w) still more preferably about 0.1% (w/w). Thus, if needed, the obtained water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a physiological active substance is used, a vacuum drying or after freeze-drying. the content of the water poorly soluble polyvalent metallic salt of the inside of the sustained release drug of this invention, and a physiological active substance -- general -- about 0.1% (w/w) -- or they are about 1% (w/w) thru/or about 30% (w/w) preferably about 50% (w/w).

[0013] A macromolecule polymerization object refractory in water, or insoluble as a biodegradation nature polymer, for example, the example of aliphatic series polyester [and alpha-hydroxycarboxylic acid (an example --) hydroxy dicarboxylic acid (an example --), such as a glycolic acid, a lactic acid, and hydroxybutyric acid Homopolymer [which was compounded from one or more sorts, such as hydroxy tricarboxylic acid (an example, citric acid, etc.), such as a malic acid,], copolymers, or such mixture], Polly alpha-cyano acrylic ester, and polyamino acid (an example, Polly gamma-benzyl-L-glutamic acid, etc.) are mentioned. These may be mixed and used at a proper rate. Any of random, a block, and a graft are sufficient as the format of a polymerization. A biodegradation nature polymer is aliphatic series polyester [the homopolymer compounded from one or more sorts, such as an example, alpha-hydroxycarboxylic acid, hydroxy dicarboxylic acid (an example, a glycolic acid, a lactic acid, hydroxybutyric acid, etc.), and hydroxy tricarboxylic acid (an example, malic acid, etc.) (an example, citric acid, etc.), copolymers, or such mixture] preferably. The homopolymer and copolymer which were compounded from one or more sorts of alpha-hydroxycarboxylic acid (an example, a glycolic acid, a lactic acid, hydroxybutyric acid, etc.) are desirable from a viewpoint of positive biodegradation nature and biocompatibility among the above-mentioned aliphatic series polyester. Aliphatic series polyester is the copolymer compounded from one or more sorts of alpha-hydroxycarboxylic acid (an example, a glycolic acid, a lactic acid, hydroxybutyric acid, etc.) especially preferably. Moreover, these copolymers may be mixed and used. the biodegradation nature polymer in this invention -- the very thing -- it is manufactured by the well-known approach.

[0014] Although any of D-object, L-object and D, and L-object are sufficient as the above-mentioned alpha-hydroxycarboxylic acid, D-object / L-object (a mol / mol %) does not have about 75/25, and its thing of the range of 75 is desirable about 25/. D-object / L-object (a mol / mol %) is about 30 [about 60/40 thru/or]/70 still more preferably. As an example of the

copolymer of the above-mentioned alpha-hydroxycarboxylic acid, the copolymer of a glycolic acid and other alpha-hydroxy acids is mentioned, and a lactic acid and 2-hydroxybutyric acid are desirable as these alpha-hydroxy acids. The copolymer of alpha-hydroxycarboxylic acid is a lactic-acid-glycolic-acid copolymer or a 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer preferably. The copolymer of alpha-hydroxycarboxylic acid is a lactic-acid-glycolic-acid copolymer especially preferably.

[0015] In a lactic-acid-glycolic-acid copolymer, the presentation ratio (a lactic acid/glycolic acid) (a mol / mol %) does not have about 100/0, and 60 is desirable about 40/. This presentation ratio is about 45 [about 90/10 thru/or]/55 still more preferably. A presentation ratio is about 45 [about 80/40 thru/or]/55 especially preferably. the weight average molecular weight of a lactic-acid-glycolic-acid copolymer -- about 3,000 thru/or about 20,000 -- desirable -- about 3,000 thru/or about 14,000 -- it is about 3,000 thru/or 12,000 still more preferably. Moreover, as for degree of dispersion (weight average molecular weight/number average molecular weight) of a lactic-acid-glycolic-acid copolymer, about 1.2 to about 4.0 is desirable. It is about 1.5 to about 3.5 still more preferably. a lactic-acid-glycolic-acid copolymer -- the very thing -- according to a well-known manufacturing method, for example, an approach given in JP,61-28521,A, it is compoundable. As for this copolymer, what was compounded by the non-catalyst dehydration polycondensation is desirable. In a 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer, the case where glycolic acids are about 10 thru/or about 75-mol %, and the remainder is 2-hydroxybutyric acid is desirable. A glycolic acid is about 20 thru/or about 75-mol% of case still more preferably. A glycolic acid is about 30 thru/or about 70-mol% of case especially preferably. As for the weight average molecular weight of a 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer, about 2,000 thru/or about 20,000 are desirable. As for degree of dispersion (weight average molecular weight/number average molecular weight) of a 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer, about 1.2 thru/or 4.0 are desirable. Degree of dispersion is about 1.5 thru/or 3.5 especially preferably. A 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer is compoundable according to a well-known manufacturing method, for example, an approach given in JP,61-28521,A. As for this copolymer, what was compounded by the non-catalyst dehydration polycondensation is desirable. The homopolymer of a lactic acid is mentioned as a desirable example of the homopolymer of the above-mentioned alpha-hydroxycarboxylic acid. the weight average molecular weight of a lactic-acid homopolymer -- about 3,000 thru/or about 20,000 -- it is about 3,000 thru/or about 14,000 preferably. a lactic-acid homopolymer -- the very thing -- according to a well-known manufacturing method, for example, an approach given in JP,61-28521,A, it is compoundable. As for this homopolymer, what was compounded by the non-catalyst dehydration polycondensation is desirable.

[0016] The above-mentioned 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer may be used mixing with polylactic acid further. As this polylactic acid, although any of D-object, L-objects, and such mixture are sufficient, D-object / L-object (a mol / mol %) does not have about 75/25, and the thing of the range of 80 is desirable about 20/. D-object / L-object (a mol / mol %) is about 25 [about 60/40 thru/or]/75 still more preferably. D-object / L-object (a mol / mol %) is about 25 [about 55/45 thru/or]/75 especially preferably. the weight average molecular weight of this polylactic acid -- about 1,500 thru/or about 20,000 -- it is about 1,500 thru/or about 10,000 preferably. Moreover, as for degree of dispersion of polylactic acid, about 1.2 thru/or about 4.0 are desirable. Degree of dispersion is about 1.5 thru/or about 3.5 especially preferably. About the manufacturing method of polylactic acid, the approach of carrying out ring opening polymerization of the lactide which is the dimer of a lactic acid, and the approach of carrying out the dehydration polycondensation of the lactic acid are learned. In order to obtain the comparatively low-molecular polylactic acid used by this invention, the approach of carrying out the direct dehydration polycondensation of the lactic acid is desirable. This approach is indicated by JP,61-28521,A. When mixing and using a 2-hydroxybutyric acid-glycolic-acid copolymer and polylactic acid, the mixing ratio is about 90 [about 10/90 thru/or]/10 (% of the weight). A mixing ratio is about 80 [about 20/80 thru/or]/20 preferably. Mixing ratios are about 30/70 thru/or 70/30 still more preferably.

[0017] Weight average molecular weight means the molecular weight of the polystyrene

conversion which weight average molecular weight measured with gel permeation chromatography (GPC) by using as a reference material the polystyrene which is nine kinds, 120,000, 52,000, 22,000, 9,200, 5,050, 2,950, 1,050, 580, and 162, among this specification. Number average molecular weight is also calculated by GPC measurement. Degree of dispersion is calculated from weight average molecular weight and number average molecular weight. GPC measurement used GPC column KF804L x 2 (Showa Denko make) and the RI monitor L-3300 (Hitachi make), and used chloroform as a mobile phase.

[0018] Generally the copolymer compounded by the above-mentioned non-catalyst dehydration polycondensation has the carboxyl group of isolation at the end. In this invention, a biodegradation nature polymer has the carboxyl group of isolation at the end preferably. The biodegradation nature polymer which has the carboxyl group of isolation at the end is a biodegradation nature polymer the number average molecular weight by GPC measurement and whose number average molecular weight by the end group determination correspond mostly. The number average molecular weight by the end group determination is the following, and is made and computed. It is 0.05 N about the carboxyl group in this solution, dissolving a biodegradation nature polymer (about 1g thru/or 3g) in the mixed solvent of an acetone (25 ml) and a methanol (5ml), and using a phenolphthalein as an indicator. It titrated promptly under churning at a room temperature with an alcoholic potassium hydroxide solution, and the number average molecular weight by the end group determination was computed by the degree type.

Number average molecular weight by the end group determination = $20,000 \frac{A}{BA}$: Mass of a biodegradation nature polymer (g) B: It added even to the titration end point. 0.05 N Alcoholic potassium hydroxide solution It is compounded by the non-catalyst dehydration polycondensation method from (ml, for example, one or more kinds of alpha-hydroxy acids), and the number average molecular weight by GPC measurement and the number average molecular weight by the end group determination are mostly in agreement in the polymer which has the carboxyl group of isolation at the end. On the other hand, it is compounded by the ring-opening-polymerization method using a catalyst from an annular dimer, and the number average molecular weight by the end group determination far exceeds the number average molecular weight by GPC measurement in the polymer which essentially does not have an isolation carboxyl group at the end. The polymer which has the carboxyl group of isolation at the end by this difference is clearly distinguishable from the polymer which does not have an isolation carboxyl group at the end.

[0019] The number average molecular weight by GPC measurement to the number average molecular weight by the end group determination being an absolute value Various analysis, Although the most important evaluation is difficult since it is the relative value changed with analysis conditions (for example, selection of the class of mobile phase, the class of column, a reference material, and slice width of face, selection of the base line, etc.) For example, it says that the number average molecular weight according that the number average molecular weight by GPC measurement and the number average molecular weight by the end group determination are mostly in agreement to the end group determination is within the limits of about 0.5 times of the number average molecular weight by GPC measurement thru/or about twice. Preferably, it says that it is within the limits of about 0.8 times thru/or about 1.5 times. Moreover, the case where the number average molecular weight according that the number average molecular weight by the end group determination far exceeds the number average molecular weight by GPC measurement to the end group determination exceeds the twice [about] of the number average molecular weight by GPC measurement is said.

[0020] The sustained release drug of this invention is manufactured by distributing or dissolving the water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a physiological active substance which mixes a physiological active substance and water-soluble polyvalent metallic salt, and is obtained in a biodegradation nature polymer. As a manufacturing method of a sustained release drug, the approach of applying, for example to the underwater drying method, a phase separation method, a spray drying method, or these etc. is mentioned. Below, the manufacture approach in the case of manufacturing a microcapsule is described as a sustained release drug.

[0021] (b) The underwater drying method (o/w law)

In this approach, the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer is produced first. As for the organic solvent used in the case of manufacture of the sustained release drug of this invention, it is desirable that the boiling point is 120 degrees C or less. As this organic solvent, halogenated hydrocarbon (an example, dichloromethane, chloroform, carbon tetrachloride, etc.), alcohols (ethanol, methanol), an acetonitrile, etc. are mentioned, for example. These may be mixed and used at a proper rate. Organic solvents are dichloromethane and an acetonitrile preferably. An organic solvent is dichloromethane especially preferably. Although the concentration in the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer changes with the molecular weight of a biodegradation nature polymer, classes of organic solvent, etc., generally it is chosen from about 0.01 thru/or about 80% (w/w). There is no about 0.1 still more preferably and they are about 1 thru/or about 60% especially preferably about 70% (w/w). Thus, into the organic solvent solution of the obtained biodegradation nature polymer, as occasion demands, freeze drying or after carrying out a vacuum drying, it adds, and the water-insoluble nature or water poorly soluble polyvalent metallic salt of a physiological active substance is dissolved. Under the present circumstances, it is made for the upper limit of the weight ratio of a complex:biodegradation nature polymer to become desirable to about 1:2 to about 1:3 as for the addition of complex. Subsequently, after adding further the organic solvent solution prepared by doing in this way into the aqueous phase and making an o/w emulsion form using a turbine mold agitator etc., an oil phase solvent is evaporated and a microcapsule is manufactured. Generally the aqueous-phase volume in this case is chosen from about 1 time of the oil phase volume thru/or about 10,000 times. It is chosen out of twice [about] thru/or about 5,000 times still more preferably. It is especially chosen out of about 5 times thru/or about 2,000 times preferably. An emulsifier may be added into the aqueous phase outside the above. As long as this emulsifier can generally form a stable o/w emulsion, any are sufficient as it. As an emulsifier, an anionic surface active agent, a nonionic surfactant, a polyoxyethylene-castor-oil derivative, a polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcohol, a carboxymethyl cellulose, lecithin, gelatin, hyaluronic acid, etc. are mentioned, for example. These may be used combining them suitably. The concentration of the emulsifier in the outside aqueous phase is about 0.001% thru/or 20% (w/w) preferably. About 0.01% cannot be found still more preferably and they are about 0.05% thru/or 5% (w/w) especially preferably 10% (w/w). In the above-mentioned o/w method, a microcapsule may be manufactured by the approach, i.e., the s/o/w method, of distributing complex in the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer.

[0022] (b) The underwater drying method (w/o/w law)

In this approach, the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer is manufactured first. Under the present circumstances, although the concentration in the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer changes with the molecular weight of a biodegradation nature polymer, classes of organic solvent, etc., generally it is chosen from about 0.01 thru/or about 80% (w/w). There is no about 0.1 still more preferably and they are about 1 thru/or about 60% especially preferably about 70% (w/w). The water dispersion of complex is used as an inland water phase. The concentration in the water dispersion of complex is about 10% (w/v) thru/or about 90% (w/v). The water dispersion of the above-mentioned complex is emulsified in the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer, it distributes, and a w/o emulsion is manufactured. Emulsification actuation is performed by the well-known distributed approach. Emulsification actuation is performed using for example, a turbine mold agitator, a homogenizer, etc. Under the present circumstances, it is made for the upper limit of the weight ratio of an inland water phase and a biodegradation nature polymer to become to about 1:3 preferably to about 1:2. the ratio of an inland water phase and the organic solvent solution of a biodegradation nature polymer -- 1:1,000 (v/v) thru/or 1:1 (v/v) -- desirable -- 1:100 (v/v) thru/or 1:5 (v/v) -- it is 1:50 (v/v) thru/or 1:5 (v/v) especially preferably. Subsequently, the w/o emulsion manufactured by doing in this way is further added into the aqueous phase, a w/o/w emulsion is manufactured, an oil phase solvent is evaporated and a microcapsule is manufactured. Concrete operations apply to the above-mentioned (b).

[0023] As for the sustained release drug used by this invention, it is desirable that it is a

particle-like. A sustained release drug is because the direction prescribed for the patient through the hypodermic needle used for hypodermically [usual] or an intramuscular injection does not give too much pain to a patient. The particle diameter of this sustained release drug does not have about 0.1 as mean particle diameter, does not have about 1 [300-micrometer] preferably, and is about 2 thru/or 100 micrometers especially preferably 150 micrometers. A particle-like sustained release drug may be called a microcapsule among this specification. A microcapsule may be called a microsphere.

[0024] The sustained release drug of this invention can be pharmaceutical-preparation-ized to various dosage forms by the ability using the microcapsule as a microcapsule as a source material, and can be prescribed for the patient as parenteral agents (passing membrane agent [uterus the injections to an example, intramuscular, hypodermically, an organ, etc. or an embedding agent a nasal cavity, the rectum,] etc.), oral agents (liquids and solutions, such as solid preparations, such as an example, capsules (an example, hard capsules, elastic capsule, etc.), a granule, and powder, and suspension etc.), etc. As for especially a sustained release drug, in this invention, it is desirable that it is an object for injection. For example, when a sustained release drug is a microcapsule, the practical gradual release pharmaceutical preparation for injection is obtained by making a microcapsule into the mixture with dispersants (polysaccharide, such as a surface active agent of an example, Tween 80, HCO-60, etc., a carboxymethyl cellulose, sodium alginate, and hyaluronic acid etc.), preservatives (an example, methylparaben, propylparaben, etc.), isotonicizing agents (an example, a sodium chloride, a mannitol, a sorbitol, grape sugar, etc.), etc. Moreover, it considers as the thing which mixed the lipid by which lecithin etc. is not in vegetable oil, such as sesame oil and corn oil, or this, or the sustained-release injections which distributes with a medium-chain-fatty-acid triglyceride (an example, migriol 812), and can actually be used as oily suspension.

[0025] When a sustained release drug is a microcapsule, about 0.1 thru/or the range of about 300 micrometers are mentioned as mean particle diameter that the particle diameter of a microcapsule should just be range with which it is satisfied of the degree of dispersion and needle penetration nature in using it as suspension for injection. Particle diameter does not have about 1 preferably and about 2 thru/or the range of it are about 100 micrometers especially preferably about 150 micrometers. Although the approach of making all manufacture processes sterile, the approach of sterilizing by the gamma ray, the approach of adding antiseptics, etc. are mentioned in order to use the above-mentioned microcapsule as sterile preparation, it is not limited especially.

[0026] The sustained release drug of this invention can be used for insurance to mammalians (an example, Homo sapiens, a cow, a pig, a dog, a cat, a mouse, a rat, rabbit, etc.) by low toxicity. Adaptation of the sustained release drug of this invention changes with physiological active substances to be used. The sustained release drug of this invention is effective in the therapy or prevention of the neutropenia after cancer chemotherapy etc., when a physiological active substance is an insulin, it is interferon-alpha at a diabetic therapy or prevention, it is erythropoietin at the therapy or prevention of a renal cancer, hepatitis C, etc., and it is a growth hormone at an anemic therapy or prevention, and it is a granulocyte colony-stimulating factor at the therapy or prevention of hypoplasia etc. Moreover, when a physiological active substance is erythropoietin, the sustained release drug of this invention is effective also in the hematogenous promotion for an autotransfusion. Although the dose of a sustained release drug changes variously with the class of physiological active substance, a content and the persistence time of emission, the object illness, object animals, etc., it should just be an effective dose of a physiological active substance. As a dose per time of this physiological active substance, when a sustained release drug is one-week mold pharmaceutical preparation, for example, they are one adult and abbreviation preferably. 0.0001 Or it can choose out of the range of 10 mg/kg weight suitably. It is abbreviation still more preferably. 0.0005 Or it can choose out of the range of 1 mg/kg weight suitably. The dose of a sustained release drug is abbreviation preferably per time one adult. 0.0005 Or it can choose out of the range of 50 mg/kg weight suitably. It is abbreviation still more preferably. It can choose out of the range of 0.0025 thru/or 10 mg/kg weight suitably. The count of administration can be chosen at 1 time and two weeks, and can

choose it as four weeks suitably once at one week by the class of physiological active substances, such as 1 etc. time, a content, a pharmaceutical form and the persistence time of emission, the object illness, an object animal, etc. Although preservation of the pharmaceutical preparation of this invention is saved in ordinary temperature or a cool place, it is a cool place preferably. Ordinary temperature or a cool place here is defined in a Japanese pharmacopoeia. That is, 15 thru/or 25 degrees C are meant as ordinary temperature, and 15 degrees C or less are meant as a cool place.

[0027]

[Example] Although an example is given to below and this invention is explained to it still more concretely, these do not limit this invention.

The solution made to dissolve the pig insulin (27.3U/mg, DIOSHINSU, Netherlands) of 10.5g of examples of reference in 22ml of 100mM sodium-hydroxide water solutions and the solution made to dissolve 1g zinc acetate (two hydrates) in 10ml distilled water were mixed, and it was left at the room temperature for 1 hour. About 3,000 rpm Centrifugal separation actuation was performed (05--22, Hitachi), and supernatant liquid was thrown away. Centrifugal separation was again performed further for this after distributing to distilled water. After throwing away supernatant liquid, little distilled water was added, it freeze-dried, and about 1g rough pig insulin zinc salt was obtained as desiccation powder. In order to investigate the insulin content in the obtained powder, it shook for 3 hours, the EDTA solution of 50mM(s) which contain an acetonitrile 30% extracted, and the quantum was carried out with high performance chromatography (HPLC). Consequently, 47.6mg of pig insulins was contained per 100mg of desiccation powder.

[0028] 104g of nitroso ethylurea was added little by little to 168ml of 240% potassium-hydroxide water solutions of examples of reference, and ethyl ether 1,000ml mixture under ice-cooling churning. The ether layer of the produced yellow was separated, and the granular potassium hydroxide was added and it dried. Subsequently, the potassium hydroxide was removed and about 900ml of diazo ethane solutions was obtained. The lactic-acid-glycolic-acid copolymer (a lactic acid/glycolic acid = 50/50 (a mol / mol %)) of weight average molecular weight 5,800 [about] and 130g were dissolved in 1,900ml of methylene chlorides, and churning cooling was carried out. The above-mentioned diazo ethane solution was dropped under ice-cooling, and it agitated under the room temperature after that for 2 hours. Ethyl ester 131g of a lactic-acid-glycolic-acid copolymer was obtained by carrying out reduced pressure distilling off of the solvent after overnight neglect, and carrying out the vacuum drying of the residue at a room temperature.

[0029] In the solution which dissolved the human growth hormone (a biotechnology general company, U.S.) of 31mg of examples of reference in 0.9ml distilled water, the water solution which dissolved the zinc acetate (dihydrate) of 9.98, 29.43, 49.88, 69.84, 79.81, or 99.77microg in distilled water of 100microl was mixed. The mole ratios of zinc/growth hormone are 1, 3, 5, 7, 8, and 10, respectively. When this mole ratio was 5, about 60% of the growth hormone precipitated, and about 100% of growth hormone precipitated or more by seven.

[0030] 1ml (200mg/(ml)) of zinc acetate (two hydrates) water solutions and 1ml of 1 convention sodium hydroxides were added to 200ml (40 billion international units are contained) of example 1 interferon-alpha water solutions, and it put at 4 degrees C after mixing overnight. By 3,000rpm, insoluble complex was collected after centrifugal separation, it freeze-dried, and about 200mg rough interferon-alpha zinc salt was obtained. In the solution which dissolved ethyl ester 1.5g of 1.5g (a lactic acid / glycolic-acid ratio = 50/50, molecular weight 5800, Wako Pure Chem make) of lactic-acid-glycolic-acid copolymers, and the lactic-acid-glycolic-acid copolymer obtained in the example 2 of reference in dichloromethane 4ml, the 200mg of the above mentioned rough interferon-alpha zinc salt was added, it stirred for about 30 seconds with the homogenizer (poly TRON) in it, and the s/o emulsion was obtained in it. 0.1% which adjusted the obtained s/o emulsion at 18 degrees C beforehand (w/w) 700ml of polyvinyl alcohol (EG-40, product made from Japanese synthetic chemistry) water solutions It pours into inside, a turbine mold homomixer is used, and it is 6,000 rpm. It considered as the s/o/w emulsion. This s/o/w emulsion was agitated at the room temperature for 3 hours, dichloromethane was vaporized, and

the oil phase was solidified. Subsequently, about 2,000 rpm Centrifugal separation actuation was performed (05—22, Hitachi), and supernatant liquid was thrown away. Centrifugal separation was again performed further for the residue obtained after distributing to distilled water. After having added 50mg of D-mannitol to the microcapsule by which uptake was carried out, adding still more nearly little distilled water and re-distributing, these dispersion liquid were freeze-dried and the powder-like microcapsule was obtained.

[0031] It is dichloromethane 6.6g (5ml) in 3.6g (a lactic acid/glycolic acid = 75/25 (a mol / mol %), weight average molecular weight 13,585, number average molecular weight 4,413, product made from the Wako Pure Chem industry) of example 2 lactic-acid-glycolic-acid copolymers. In addition, it dissolved. Moreover, it is dichloromethane 6.6g (5ml) in 420mg (200mg of pig insulins is contained) of rough pig insulin zinc salt obtained in the example 1 of reference. After distributing and mixing both, it stirred for about 10 seconds with the homogenizer (poly TRON), and the s/o emulsion was obtained. 0.1% which adjusted the obtained s/o emulsion at 18 degrees C beforehand (w/w) It pours in into 800ml of polyvinyl alcohol (EG-40, product made from Japanese synthetic chemistry) water solutions, a turbine mold homomixer is used, and it is 6,000 rpm. It considered as the s/o/w emulsion. This s/o/w emulsion was agitated at the room temperature for 3 hours, dichloromethane was vaporized, and the oil phase was solidified. Subsequently, about 2,000 rpm Centrifugal separation actuation was performed (05—22, Hitachi), and supernatant liquid was thrown away. . Centrifugal separation was again performed further for the residue obtained after distributing to distilled water. After having added 50mg of D-mannitol to the microcapsule by which uptake was carried out, adding still more nearly little distilled water and re-distributing, these dispersion liquid were freeze-dried and the powder-like microcapsule was obtained (about 3g recovery). In order to investigate the insulin content in the obtained microcapsule, it shook for 3 hours, the EDTA solution of 50mM(s) which contain an acetonitrile 30% extracted, and the quantum was carried out with high performance chromatography (HPLC). Consequently, 6.2mg of insulins was contained per microcapsule 100mg.

[0032] 1g of zinc chlorides was added to 8ml (Espo TM a parenteral solution 3000, Sankyo Co., Ltd. make) (12000 international units are contained) of example 3 erythropoietin parenteral solutions small quantity every, and it was left at the room temperature for 1 hour. After carrying out centrifugal separation of the mixed liquor obtained by 3,000rpm and distributing precipitate again to distilled water, precipitate was further obtained according to centrifugal separation. Little distilled water was added to this sediment, it freeze-dried, and 60mg of mixture of rough erythropoietin zinc salt and rough albumin zinc salt was obtained as powder. In the solution which dissolved 0.5g (a lactic acid / glycolic-acid ratio = 50/50, molecular weight 14000, Wako Pure Chem make) of lactic-acid-glycolic-acid copolymers in dichloromethane 1.5ml, 60mg of mixture of above mentioned rough erythropoietin zinc salt and rough albumin zinc salt was added, it stirred for about 30 seconds with the homogenizer (poly TRON) in it, and the s/o emulsion was obtained in it. Subsequently, powder-like microcapsule 152mg was obtained like the example 1.

[0033] The example 4 human growth hormone (Genotropin TM 16IU, the Sumitomo Pharmaceuticals incorporated company make) was dissolved in 1ml of distilled water, 100micro (10mg/(ml)) of zinc chloride water solutions I was added further, and it was left at the room temperature for 1 hour. After carrying out centrifugal separation of the mixed liquor obtained and distributing precipitate again to distilled water, precipitate was further obtained according to centrifugal separation. Little distilled water was added to this precipitate, it freeze-dried, and 5.6mg of rough human growth hormone zinc salt was obtained as powder. In the solution which dissolved 0.5g (a lactic acid / glycolic-acid ratio = 75/25, molecular weight 9,800, Wako Pure Chem make) of lactic-acid-glycolic-acid copolymers in dichloromethane 1.5ml, the 5.6mg of the above mentioned rough human growth hormone zinc salt was added, it stirred for about 30 seconds with the homogenizer (poly TRON) in it, and the s/o emulsion was obtained in it. Subsequently, powder-like microcapsule 121mg was obtained like the example 1.

[0034] After making example 5 granulocyte-colony-stimulating-factor (G-CSF) parenteral solution [fill glass CHINNOIPOJIEN (Filgrastin Neupogen) (trade name), Amgen, Inc., and U.S.] 10ml (3x10⁸ international units are contained) into neutrality in a rare sodium-hydroxide water

solution, 1ml (10mg/(ml)) of zinc chloride water solutions was added, and it was left at the room temperature for 1 hour. After carrying out centrifugal separation of the mixed liquor obtained and distributing precipitate again to distilled water, precipitate was further obtained according to centrifugal separation. Little distilled water was added to this precipitate, it freeze-dried, and 4mg of rough granulocyte colony-stimulating factor zinc salt was obtained as powder. In the solution which dissolved 0.5g (a lactic acid / glycolic-acid ratio = 50/50, molecular weight 8,000, Wako Pure Chem make) of lactic-acid-glycolic-acid copolymers in dichloromethane 1.5ml, the 4mg of the above mentioned rough granulocyte colony-stimulating factor zinc salt was added, it stirred for about 30 seconds with the homogenizer (poly TRON) in it, and the s/o emulsion was obtained in it. Subsequently, powder-like microcapsule 110mg was obtained like the example 1. [0035] After dissolving example 6 human-insulin (Homo sapiens recombinant insulin, Wako Pure Chem make) 5.21mg (26U/mg) in 0.63ml of 57mM hydrochloric-acid water solutions, 0.35ml of 0.05-N sodium-hydroxide water solutions was added, and pH obtained the human insulin solution near neutrality. 0.2ml (20mg/(ml)) of zinc acetate water solutions was added to this human insulin solution, and one evening was left at 4 degrees C. After carrying out centrifugal separation of the mixed liquor obtained by about 3,000 rpm and distributing precipitate again to distilled water, precipitate was further obtained according to centrifugal separation. Little distilled water was added to this precipitate, it freeze-dried, and 11mg of rough human insulin zinc salt was obtained as powder. In the solution which dissolved 0.5g (a lactic acid / glycolic-acid ratio = 50/50, molecular weight 6,000, Wako Pure Chem make) of lactic-acid-glycolic-acid copolymers in dichloromethane 1.5ml, the 11mg of the above mentioned rough human insulin zinc salt was added, it stirred for about 30 seconds with the homogenizer (poly TRON) in it, and the s/o emulsion was obtained in it. Subsequently, powder-like microcapsule 105mg was obtained like the example 1.

[0036] 0.9g (a lactic acid / glycolic-acid ratio = 50/50, molecular weight 6,000, Wako Pure Chem make) of example lactic-acid of comparison-glycolic-acid copolymers was dissolved in dichloromethane 1.5ml. Human insulin 100mg (0.0001% (w/w) of zinc contents (below)) which hardly contains zinc in this solution was added, it agitated for about 10 seconds with the vortex mixer after mixing and at a homogenizer (poly TRON), and the s/o emulsion was obtained. Subsequently, powder-like microcapsule 470mg was obtained like the example 1. In order to investigate the insulin content in the obtained microcapsule, it shook for 3 hours, the EDTA solution of 50mM(s) which contain an acetonitrile 30% extracted, and the quantum was carried out with high performance chromatography (HPLC). Consequently, 8.7mg of insulins was contained per microcapsule 100mg.

[0037] It distributed to 1ml (what dissolved a 5mg [per 1ml of distilled water] carboxymethyl cellulose, 1mg polysorbate 80, and a 50mg mannitol) of dispersion mediums for injection, and microcapsule 323mg of the shape of powder acquired in the example of experiment 1 example 2 was administered hypodermically behind the male SD system rat of 6 weeks old (insulin dose: about 20mg per animal). After administration, it collected blood from the tail with time, and the pig insulin concentration in a blood serum was measured by the enzyme immunological technique (EIA) (Sanko Junyaku make). Consequently, the pig insulin which has activity in a blood serum was detected one week or more after administration.

[0038] It distributed to 0.5ml (solution which dissolved a 5g carboxymethyl cellulose, 2g polysorbate 80, and a 50g mannitol in distilled water 1L) of dispersion mediums for injection, and microcapsule 70mg obtained in the example of experiment 2 example 4 was administered hypodermically behind the 6-weeks old male Sprague-Dawley rat (growth-hormone dose: about 3mg per animal). After administration, it collected blood from the tail with time, and the growth hormone concentration in a blood serum was measured by radioimmunoassay (RIA). Consequently, the growth hormone which has activity in a blood serum was detected one week or more after administration.

[0039] Microcapsule 154.7mg of the shape of powder acquired in the example of the example comparison of comparative experiments was distributed to 1.75ml (what dissolved a 5mg [per 1ml of distilled water] carboxymethyl cellulose, 1mg polysorbate 80, and a 50mg mannitol) of dispersion mediums for injection, and the male SD system rat of 6 weeks old carried out regions-

of-back hypodermic administration (insulin dose: about 44mg per animal). After administration, it collected blood from the tail with time, and the human insulin concentration in a blood serum was measured by the enzyme immunological technique (EIA). Consequently, most insulins were not detected in the blood serum after after [administration] the 1st.

[0040]

[Effect of the Invention] According to this invention, the enclosure effectiveness of a physiological active substance is raised and the sustained release drug which controlled the exsorption in early stages of after administration is obtained. Moreover, the sustained release drug of this invention can be released gradually, holding the bioactive of a physiological active substance after [in the living body] administration. Furthermore, the physiological active substance in a sustained release drug is maintained at stability over a long period of time, and there is little loss of bioactive.

[Translation done.]

THIS PAGE BLANK (USPTO)